

Aus der Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
des Robert Koch-Institutes Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

Tierversuche zur oralen Impfung gegen menschenpathogene, Enteritis erregende Salmonellen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Evamaria Kinne geb. Saffran
aus Berlin

1967

Aus der Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
des Robert Koch-Institutes Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

Tierversuche zur oralen Impfung gegen menschenpathogene, Enteritis erregende Salmonellen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Evamaria Kinne geb. Saffran
aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med. Alfred N. W i t t

Referent: Professor Dr. med. Hansjürgen R a e t t i g

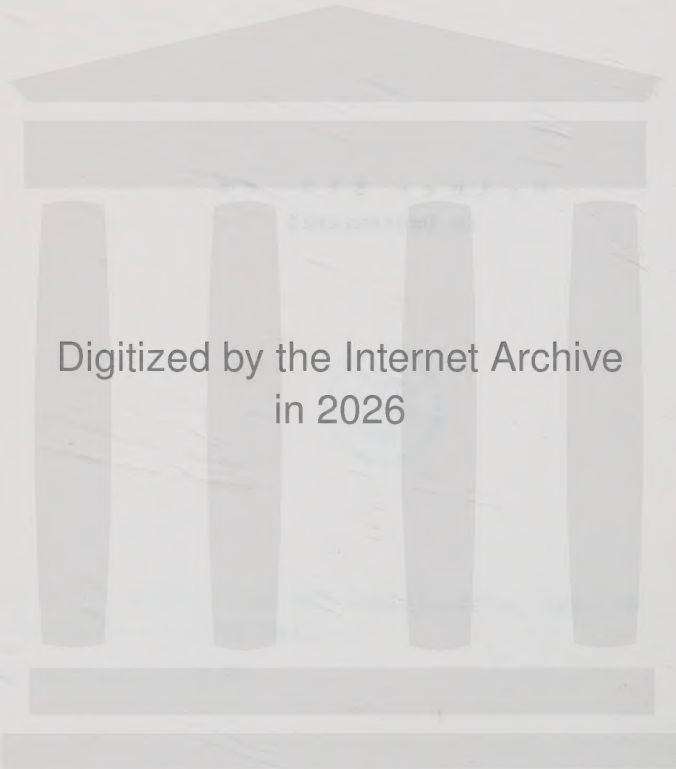
Korreferent: Professor Dr. med. Bernhard S c h m i d t



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 19.9.67

M e i n e n E l t e r n
in Dankbarkeit



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Vorversuche zur Mäusepathogenität	
a) Material und Methoden	9
b) Ergebnisse	9
Versuche zur oralen Immunisierung	
a) Material und Methoden	13
b) Ergebnisse	16
Diskussion	41
Zusammenfassung	49
Literaturverzeichnis	50

Die Arbeit enthält 14 Abbildungen

Einleitung

Aus den jährlichen Statistiken für Infektionskrankheiten des Bundesgesundheitsamtes ergibt sich, daß die Zahl der gemeldeten Erkrankungen an Typhus abdominalis und Paratyphus A und B von 8 600 bzw. 6 000 Krankheitsfällen im Jahr 1949 auf einen Stand weit unter 1 000 Erkrankungen im Jahr 1965 zurückgegangen ist (3).

Die antibiotische Therapie hat entgegen den Hoffnungen, die man in sie gesetzt hatte, keine Senkung des Prozentsatzes der Ausscheider nach überstandener Krankheit und auch keine überzeugenden Resultate in der Behandlung der Ausscheider gebracht. Da es auch Schutzimpfungen nicht in epidemiologisch wirksamen Ausmaßen gegeben hat, kann die Abnahme der Morbidität nur mit der Durchführung der seuchenhygienischen Forderungen, die zur Unterbrechung möglicher Infektketten geführt hat, erklärt werden.

Im Gegensatz zu dieser stetigen Abnahme der Typhus- und Paratyphusmorbidität hat die Zahl der Erkrankungen durch die Salmonellen, die beim Menschen eine Gastro-Enteritis erzeugen können, seit dem Jahr 1956 sprunghaft zugenommen und steigt seit 1962 weiter an (Abb. 1).

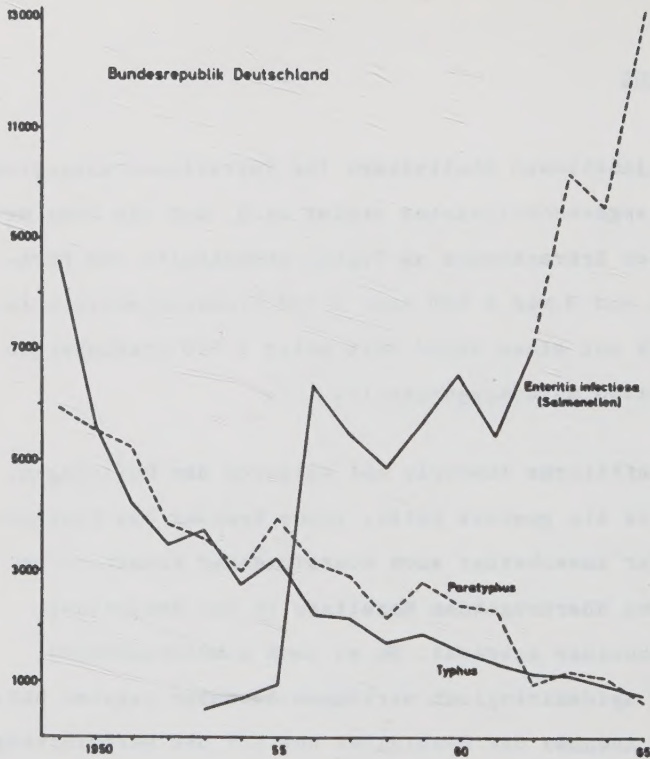


Abb. 1: Zahl der Erkrankungen an Typhus, Paratyphus und Enteritis infectiosa in der Bundesrepublik Deutschland einschließlich West-Berlins in den Jahren von 1949 bis 1965.

Die Zahlen für die Krankheitsfälle an Typhus und Paratyphus stammen aus den Statistiken für Infektionskrankheiten im Bundesgesundheitsblatt (3).

Die Zahlen für die Erkrankungen durch Salmonellen der Enteritis-Gruppe stellen eine Zusammenfassung aller Befunde der Hygiene-Institute und Medizinaluntersuchungsämter der Bundesrepublik Deutschland und West-Berlins durch die Salmonella-Zentrale dar. (Es handelt sich bei diesen Befunden um bakteriologisch gesicherte Erstisolierungen aus Stuhl und Erbrochenem bei akuter Enteritis (12, 13, 35,

38,40). Für die Jahre 1963, 1964 und 1965 liegen bisher derartige Zusammenstellungen noch nicht vor. Die angegebenen Werte (= unterbrochene Linie in Abb. 1) habe ich aus den Zahlen des Bundesgesundheitsamtes durch Multiplikation mit 2,2 extrapoliert, da die Erstisolierungen in den letzten Jahren um diesen Faktor durchschnittlich höher lagen als die gemeldeten Fälle.)

Dabei ist zu bedenken, daß die Zahlen, die in Abb. 1 wiedergegeben sind, sicherlich nur einen Ausschnitt der tatsächlichen Verseuchung darstellen, da der Anteil der leichteren Krankheitsfälle, die weder gemeldet noch bakteriologisch untersucht wurden, wahrscheinlich ein Mehrfaches beträgt.

In Abb. 1 zeigt die Kurve der jährlichen Erkrankungen durch Salmonellen der Enteritis-Gruppe von 1955 mit knapp 1000 Krankheitsfällen einen Anstieg zum Jahr 1956 auf über 6000 Krankheitsfälle. Diese starke Zunahme kann nicht durch ein plötzlich erwachtes Interesse oder durch eine häufiger geübte und verbesserte Diagnostik erklärt werden, denn es hat seit 1955 keine Verbesserung in der Erfassung und Diagnostik der Salmonellen-Enteritis gegeben. Hier müssen andere Einflüsse in Betracht gezogen werden. Die plötzliche Steigerung der Morbidität um fast das 6fache von einem Jahr zum anderen ist eng mit der verbesserten wirtschaftlichen Lage Deutschlands zu dieser Zeit verbunden. Die schnell anwachsende Einfuhr von Nahrungsmitteln aus aller Welt, und damit auch von mit Salmonellen infizierten Waren, ebenso der gleichzeitig an-

steigende Import von zum Teil infizierten Futtermitteln wie Fisch- und Knochenmehle, brachten eine Zunahme der direkten und indirekten Infektion der Menschen (39).

Diese Annahme wird gestützt durch die Beobachtungen in anderen Ländern, die nach dem 2. Weltkrieg zwar zeitlich verschieden von der Bundesrepublik Deutschland, aber auch direkt abhängig von ihrer wirtschaftlichen Lage einen ähnlichen Anstieg der Erkrankungen an Salmonellen-Enteritis erlebten (Abb. 2 aus 20).

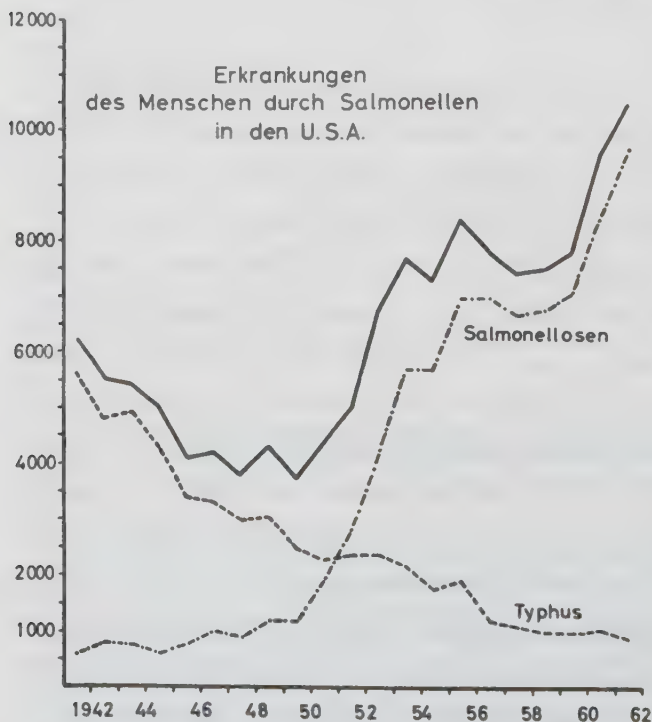


Abb. 2: Zahl der Erkrankungen durch *S. typhi* und durch Enteritis-Salmonellen in den USA in den Jahren

von 1942 bis 1962. Die ausgezogene Linie stellt die Gesamtzahl der Erkrankungen durch Salmonellen dar.

Abb. 2 zeigt am Beispiel der USA eine vergleichbare Entwicklung, die allerdings schon 1950 beginnt. Auch die mehrjährige Stagnation und der erneute Anstieg der Krankheitsfälle entsprechen den Befunden, die wir in Deutschland erheben konnten.

In den Jahren 1956-1962 blieb die Zahl der jährlichen Erstisolierungen in der Bundesrepublik Deutschland unverändert hoch, bis es 1962 wieder zu einem Anstieg, ähnlich dem von 1955/1956, kam. Nach einem geringen Rückgang im Jahr 1964 wurde 1965 der bisher höchste Stand von 13 000 Erstisolierungen registriert. Für diese erneute Zunahme der Krankheitsfälle läßt sich nicht mehr die Durchseuchung der Importe anführen, da hier seit 1962 durch die Auflage für die Lieferanten nachweislich eine Besserung beobachtet werden konnte. Die Ursache ist nun in der steigenden Zahl der Ausscheider zu suchen, die als Infektionsquellen innerhalb der Bevölkerung die Erreger verbreiten.

Ein nicht geringer Prozentsatz der Infizierten scheidet noch 10 Wochen nach der Infektion Erreger aus. Eine erfolgreiche Therapie ist oft durch die Lokalisation der Ansiedelung der Keime erschwert, da diese es unmöglich machen kann, das gewählte Antibioticum in genügend hoher Konzentration an die Keime heranzubringen.

Diese Infektionskrankheit hat zwar beim Erwachsenen meist

nur einen leichten bis mittelschweren Verlauf, für ältere Menschen kann aber eine erhöhte Gefährdung durch Herz- und Kreislaufbelastungen bestehen. Außerdem ist die Arbeitsunfähigkeit als volkswirtschaftlich bedeutsamer Faktor zu bedenken. Die größte Bedeutung kommt der Salmonellen-Enteritis in der Säuglings- und Kinderheilkunde zu. Auch in dieser Altersgruppe hat die Zahl der Erkrankungen und die Zahl der Ausscheider in den letzten Jahren zugenommen. Charakteristisch ist hier oft eine relative Schutzlosigkeit gegen Salmonelleninfekte und der Verlauf der Krankheit als Allgemeininfektion, während sie sich beim Erwachsenen meist nur an einzelnen Organen manifestiert. Besonders gefürchtet ist die Salmonellenmeningitis. Sie macht zwar nur etwa 3 % aller eitrigen Meningitiden aus, aber die Mortalität ist auch heute mit Antibioticabehandlung noch hoch. Sie beträgt etwa 50 % (36,41).

Tab. 1: Häufigkeit und Letalität der Salmonellosen bei Säuglingen und Kindern bis zum 12. Lebensjahr

Alter	Erkrankung	Tod	Letalität
0 - 1	39	12	30,7 %
1 - 2	20	3	15,0 %
2 - 3	11	0	0
3 - 12	10	0	0

Eine so hohe Durchseuchung der Bevölkerung mit Salmonellen der Enteritis-Gruppe fordert eine Seuchenprophylaxe durch aktive Impfung neben den auch weiterhin als Präventivmaßnahmen sehr wichtigen hygienischen und bakteriologischen Kontrollen.

Um Grundlagen für eine wirksame Seuchenprophylaxe zu erhalten, habe ich im Tierversuch an der Maus die Möglichkeit einer spezifischen Immunisierung gegen Salmonella-Infektionen durch orale Impfung mit hitzeinaktivierten Erregern untersucht.

Aus folgenden Überlegungen gab ich der oralen Impfung den Vorzug vor der parenteralen Impfung:

Bei einer lokalen Infektion erhält man von vornherein einen besseren Schutz bei ebenfalls lokaler Anwendung des Impfstoffs.

Außerdem handelt es sich bei der Salmonella-Infektion um eine im allgemeinen nicht tödlich verlaufende Erkrankung. Eine Impfung wird also immer nur auf freiwilliger Basis vollzogen werden können. Es verspricht daher eine orale Impfung durch die Art ihrer Applikation gegenüber der parenteralen Impfung bei der bekannten Abneigung gegen Spritzen eine höhere Beteiligung. Auch ermöglicht diese Applikation eine leichtere Organisation einer Impfung, da sie ja nicht an eine Ausführung durch Ärzte gebunden ist (32, 37).

Weiterhin haben sich noch zwei wesentliche Vorteile ergeben, die die orale Impfung gerade im Falle einer Epidemie so nützlich machen. Man hat bisher nach oraler Impfung weder heftige Allgemeinreaktionen noch Provokationen latenter Infektionen beobachtet, und der Eintritt des Schutzes erfolgt nachweislich schneller als nach parenteraler Impfung (9, 10, 25, 29, 32).

Die Möglichkeit einer oralen Immunprophylaxe ist bisher im Tierversuch nur für *S. typhi*, *S. paratyphi B* und *S. typhimurium* nachgewiesen (2, 4, 5, 6, 15, 17, 21, 28,31).

Bevor ich Ähnliches für die Salmonellen der Enteritis-Gruppe beweisen konnte, mußte ich zunächst in Vorversuchen ihre Mäusepathogenität und den erforderlichen Infektionsmodus klären, da hierüber keine Angaben in der Literatur vorlagen.

Die große Zahl an Erregern zwang zu einer Auswahl. Ich richtete mich hierbei nach den bereits erwähnten Berichten der Salmonellazentralen. Sie bildeten die Grundlage für eine Aufstellung der Salmonellen entsprechend ihrer Häufigkeit. Aus dieser Aufstellung prüfte ich die zwölf häufigsten Erreger auf ihre Mäusepathogenität. Es handelt sich um Vertreter der B, C und E-Gruppe, nämlich um:

- | | | |
|-------------------------|------------------------|------------------------------|
| 1. <i>S. infantis</i> | 5. <i>S. blockley</i> | 9. <i>S. thompson</i> |
| 2. <i>S. manchester</i> | 6. <i>S. newport</i> | 10. <i>S. heidelberg</i> |
| 3. <i>S. bareilly</i> | 7. <i>S. muenchen</i> | 11. <i>S. schwarzengrund</i> |
| 4. <i>S. anatum</i> | 8. <i>S. newington</i> | 12. <i>S. derby</i> |

Material und Methoden der Vorversuche

1. Versuchstiere:

Für die Vorversuche wurden weiße NMRI (Naval Medical Research Institute-) Mäuse aus der Zucht des Robert Koch-Institutes verwandt. Es handelte sich um Tiere beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von etwa 15 g zu Versuchsbeginn. Die Mäuse wurden zu je 10 bzw. 15 Tieren in Plastikkästen gehalten. Sie erhielten Trockenfutter 'Altromin' und Leitungswasser.

2. Infektionsmaterial:

Das Infektionsmaterial war eine Bouillon, die mit einer 24 Stunden alten Kultur des zu prüfenden Salmonellenstammes beimpft und 24 Stunden bei 37° C bebrütet wurde. Die Keimzahl wurde auf 10^9 Keime/ml eingestellt. Von jedem der zwölf Serotypen wurden mindestens 2, in den meisten Fällen 3 Stämme zur Infektion verwandt.

3. Infektion:

Zur Infektion teilte ich die Tiere in zwei Gruppen auf. Der eine Teil wurde mit 0,25 ml des Infektionsmaterials, also mit vermehrungsfähigen Salmonellen, oral mit der Sonde, der andere Teil mit 0,1 ml intraperitoneal infiziert. Die Tiere wurden 14 Tage lang beobachtet.

Ergebnisse der Vorversuche

1. Nach oraler Infektion der Maus mit Salmonellen, die beim Menschen eine Gastro-Enteritis erzeugen können, ist

die Mortalität gleich Null. Die orale Infektion erzeugt auch keine klinisch erkennbare Infektionskrankheit. Das heißt, der für den Menschen übliche Infektionsweg ist bei der Maus nicht nachahmbar.

2. Eine intraperitoneale Infektion der Maus ist durch einige Typen möglich. Die Infektionsmortalität ist aber bei den einzelnen Typen sehr unterschiedlich. Dabei zeigt sich, daß gerade die für den Menschen hochinfektiösen Salmonellen bei der Maus nur eine relativ niedrige Mortalität erzeugen.

Als Beispiel möchte ich hier *S. bareilly* anführen, der in der Aufstellung immerhin an 3. Stelle steht. Er erzeugt weder nach oraler noch nach intraperitonealer Applikation eine Infektionskrankheit bei der Maus. Für *S. infantis* (Nr. 1) und *S. anatum* (Nr. 4) ergab sich eine Mortalität um 10 %. Dagegen haben *S. heidelberg* und *S. schwarzengrund* eine Infektionsmortalität von nahezu 100 %.

In Tab. 2 sind alle geprüften Keime aufgeführt und die Ergebnisse der Versuche über eine orale und intraperitoneale Infektion der Maus angegeben.- Die einzelnen Stämme eines Serotyps zeigten alle gleiche Ergebnisse, so daß ich sie in dieser Tabelle zusammengefaßt habe.

Für *S. heidelberg*, *S. schwarzengrund*, *S. newport* und *S. blockley* als Typen mit einer hohen Mäusepathogeni-

tät prüfte ich nun die Möglichkeit einer spezifischen, aktiven, oralen Immunisierung mit inaktivierten Mikroorganismen und vergleichend mit vermehrungsfähigen Mikroorganismen.

Tabelle 2:

Keim	Gruppe	Formel	orale Infektion		intraperitoneale Infektion		Mortalität in %	
			Zahl d. Versuche	Zahl d. Tiere	Zahl d. Versuche	Zahl d. Tiere	oral	i.p.
S. heidelberg	B	4, 5, 12:r:1, 2	3	15	3	44	0	100,0
S. schwarzengrund	B	1, 4, 12, 27:d:1, 7	3	15	3	45	0	100,0
S. newport	C ₂	6, 8:e,h:1, 2	3	17	3	49	0	98,0
S. blockley	C ₂	6, 8:k:1, 5	3	18	3	46	0	95,6
S. muenchen	C ₂	6, 8:d,d ₃ ,d ₄ :1, 2	3	17	3	45	0	62,2
S. manchester	C ₂	6, 8:1,v:1, 7	4	26	4	36	0	44,4
S. anatum	E ₁	3, 10:e,h:1, 6	3	17	3	48	0	12,1
S. infantis	C ₁	6, 7:r:1, 5	3	15	3	45	0	6,6
S. newington	E ₂	3, 15:e,h:1, 6	3	15	3	44	0	4,5
S. derby	B	1, 4, 12:f,g,zg:-	3	15	3	45	0	0
S. thompson	C ₁	6, 7:k:1, 5	3	15	3	45	0	0
S. bareilly	C ₁	6, 7:y:1, 5	5	40	6	55	0	0

Material und Methoden der Versuche zur oralen Immunisierung

1. Versuchstiere:

Alle Versuche wurden wiederum an weißen NMRI-Mäusen aus der Zucht des Robert Koch-Institutes, in einem Versuch mit S. schwarzengrund zum Teil auch an Buntmäusen durchgeführt. Beide Mäusestämme reagierten ohne Unterschied in den Ergebnissen. Tiere beiderlei Geschlechts, von etwa gleicher Größe und gleichen Alters, wurden in Gruppen zu 25 - 30 Tieren in Plastikkästen gehalten und mit Trockenfutter 'Altromin' und Leitungswasser ernährt.

2. Impfstoff:

Zur Impfstoffherstellung dienten die in den Vorversuchen geprüften Stämme je eines Serotyps. Da sie eine einheitliche Infektionsmortalität gezeigt hatten, wurde der Impfstoff jeweils aus allen Stämmen gemeinsam - zu gleichen Teilen - hergestellt.

Die Bakterienkulturen wurden 24 Stunden bei 37° C auf einfachem Agar bebrütet, dann mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung (pH 7,2) von den Agarschalen abgeschwemmt. Diese Kulturabschwemmungen dienten unbehandelt als vermehrungsfähiger Impfstoff. Die Keimzahl wurde auf 10^9 Keime/ml eingestellt. Zur Verwendung als nicht vermehrungsfähiger Impfstoff wurden sie im Thermostaten bei 60° C in 75 Minuten inaktiviert. Die Keimzahl betrug ebenfalls 10^9 Keime/ml.

Jeder inaktivierte Impfstoff wurde mit den entsprechenden O - und H-Seren auf seine auch nach der thermischen Einwirkung erhalten gebliebene Antigenität geprüft. Um eventuell noch vorhandene vermehrungsfähige Keime ausschalten zu können, erfolgte eine 10tägige sorgfältige Sterilisationskontrolle durch Überimpfen von 1 ccm des inaktivierten Impfstoffes in 100 ccm Bouillon und Bebrütung bei 37° C.

3. Immunisierung:

Zu jedem Versuch mit einem Serotyp wurden die Versuchstiere in 3 gleiche Gruppen, die alle unter denselben äußeren Bedingungen gehalten wurden, aufgeteilt.

Gruppe 1: Orale Impfung mit inaktiviertem Impfstoff

Gruppe 2: Orale Impfung mit inaktiviertem Impfstoff

und zusätzliche orale Zufuhr von Tardolyt =
Aristolochiasäure, 1:10 000 verdünnt.

Gruppe 3: Kontrolltiere - ohne Impfung.

Die zusätzliche Behandlung einer Tiergruppe mit Tardolyt erfolgte, weil J.R. MÖSE eine Zunahme der unspezifischen Abwehr nach Gabe dieser Substanz beobachtet hatte (18,19). (Eine ausführliche Begründung des Einsatzes von Tardolyt wird in der Diskussion gegeben.)

Da sich aber nach Ablauf mehrerer Versuche zeigte, daß sich nicht, wie erwünscht, eine Abnahme, sondern zum Teil sogar eine Erhöhung der Endmortalität ergab, versuchte ich mit der 2. Gruppe eine orale Impfung mit vermehrungsfähigem Impfstoff. Die Vorversuche hatten ja für eine

einmalige orale Zufuhr von vermehrungsfähigen Keimen ergeben, daß diese bei der Maus keine klinisch erkennbare Infektionskrankheit erzeugen.

Neuer Versuchsansatz:

Gruppe 1: Orale Impfung mit inaktiviertem Impfstoff;

Gruppe 2: orale Impfung mit vermehrungsfähigem Impfstoff;

Gruppe 3: Kontrolltiere - ohne Impfung.

4. Dosierung und Rhythmus der Impfung:

1. Versuchsansatz:

Gruppe 1: Jede Maus erhielt an 10 aufeinanderfolgenden Tagen täglich 0,25 ml des inaktivierten Impfstoffes oral mit der Sonde. Das entspricht einer Menge von $2,5 \cdot 10^9$ inaktivierten Keimen für eine Maus. Bei dieser Impfung haben sich keine Gesundheitsbeeinträchtigungen gezeigt.

Gruppe 2: Jede Maus erhielt neben den 0,25 ml des inaktivierten Impfstoffes noch 0,25 ml Tardolyt an denselben Tagen oral mit der Sonde zugeführt.

Zweiter Versuchsansatz:

Gruppe 1: Unverändert, wie im ersten Versuchsansatz.

Gruppe 2: Jede Maus erhielt in Zeiteinheit mit der Gruppe 2 10 Tage lang täglich 0,25 ml des vermehrungsfähigen Impfstoffes oral mit der Sonde. Auch diese Zufuhr von $2,5 \cdot 10^9$ vermehrungsfähigen Keimen wurde von den Mäusen ohne jede sichtbare Beeinträchtigung vertragen.

5. Infektion:

8 - 10 Tage nach Abschluß der Impfung wurde jede Maus der drei Gruppen am gleichen Tag mit 0,1 ml einer Bouillon mit 24 Stunden alten Kulturen der Salmonellenstämmen des zur Immunisierung verwandten Serotyps intraperitoneal infiziert. Keimzahl des Infektionsmaterials: 10^9 Keime/ml.

Die Versuche wurden am 12. Tag abgeschlossen, wenn nur noch ganz vereinzelte Todesfälle eintraten, die Absterbekurve also fast waagrecht verlief.

Ergebnisse der Versuche zur oralen Immunisierung

Die Versuchsergebnisse sind graphisch in den Abbildungen 5 - 14 dargestellt. In diesen Kurven sind die Sterbeterminale der einzelnen Mäuse für jeden Tag aufsummiert. Die Sterblichkeit ist in Prozent der Zahl der gestorbenen Mäuse bezogen auf die Zahl der Tiere im Versuchsansatz berechnet.

Die statistische Sicherung (nach KOLLER) der Endmortalität ist in den Tabellen 3, 4 und 5 jeweils anschließend an die Beschreibung der einzelnen Versuchsgruppen aufgeführt.

Mit Db ist die beobachtete Differenz zwischen der Endmortalität bei den geimpften und bei den unbehandelten Tieren bezeichnet. Diese wird in Beziehung zu Dz, der größtmöglichen Zufallsdifferenz, gesetzt. Der Quotient Db:Dz ergibt den Grad der statistischen Echtheit, hier mit E bezeichnet. Ist E größer als 1, so ist der Unterschied zwischen der Mortalität der Immun- und der Kontrolltiere

statistisch gesichert.

Die Tabellen 6, 7, 8 und 9 geben anschließend an diesen Ergebnisteil eine statistische Zusammenfassung aller Versuche, die mit den einzelnen Keimen durchgeführt wurden.

Die Wirkung der oralen Impfung mit inaktiviertem oder vermehrungsfähigem Impfstoff wurde am Vergleich der Mortalität am Ende der Versuche bei den geimpften Tieren und bei den Kontrolltieren gemessen. - Die Virulenz der Infektion durch *S. newport* und *S. blockley* war in diesen Versuchen zur oralen Immunisierung geringer als in den Vorversuchen. Es ergab sich nur noch eine Infektionsmortalität um 80 %.

Bei diesen Versuchen zeigte es sich, daß die vier Keime durch den Verlauf der Absterbekurve, die sie nach intraperitonealer Infektion erzeugen, unterschieden werden können

1. in Typen mit langsam ansteigender Absterbekurve, ähnlich der, die man nach oraler Infektion mit *S. typhimurium* erhält. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine zyklische Infektion (Abb. 3).

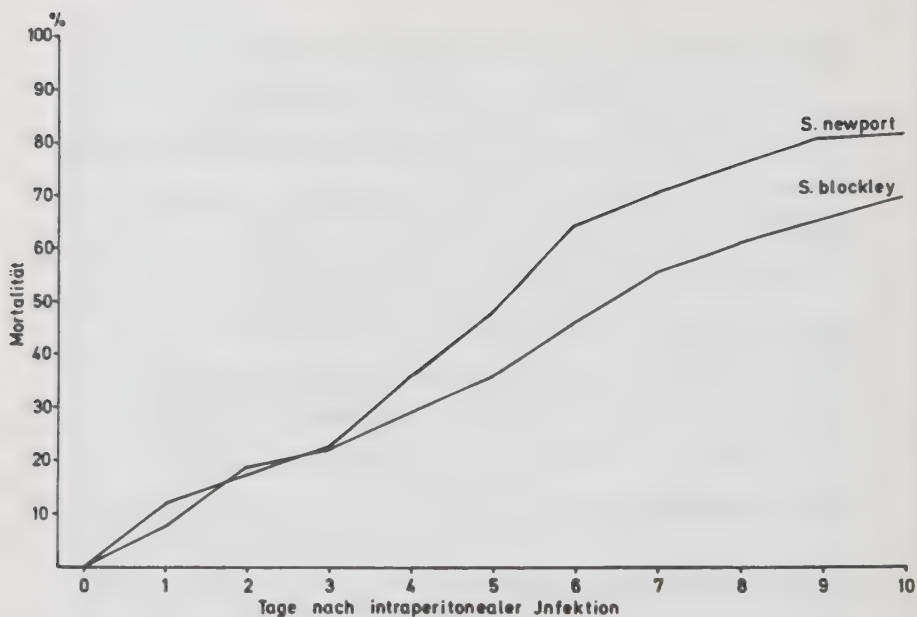


Abb. 3: Verlauf der Absterbekurve nach intraperitonealer Infektion mit *S. newport* und *S. blockley*.

2. in Typen, die eine akute, toxische Erkrankung mit hoher Endmortalität schon nach 24 - 48 Stunden setzen (Abb. 4).

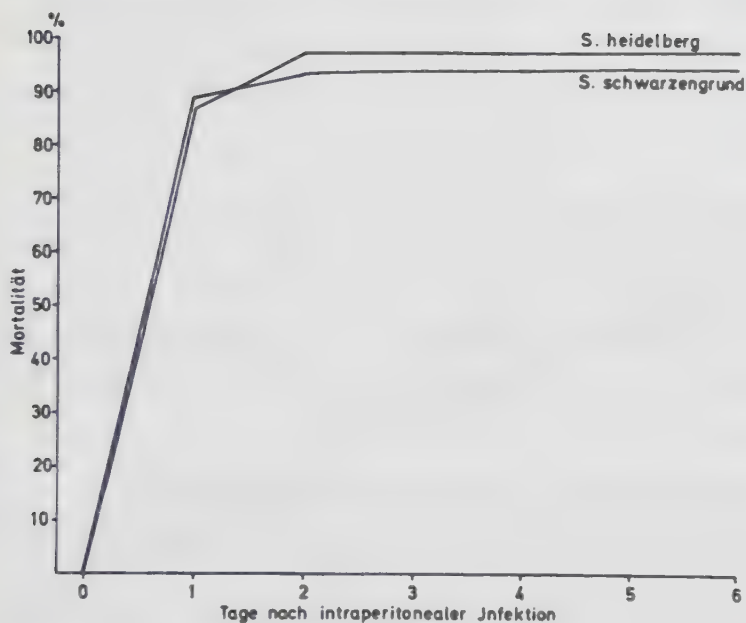


Abb. 4: Verlauf der Absterbekurve nach intraperitonealer Infektion mit *S. schwarzengrund* und *S. heidelberg*.

Dieser unterschiedliche Verlauf bildete sich auch bei den geimpften Tieren aus.

Die Sicherung, daß der Tod der Tiere wirklich auf einem Infekt durch den Erreger beruhte, mit dem ich nach der Immunisierung intraperitoneal infiziert hatte, erfolgte durch Herzblutuntersuchungen der gestorbenen Tiere. Dazu entnahm ich aus dem freigelegten Herz un-

ter sterilen Kautelen mit einer Impföse etwas Blut und strich es auf Endoagar-Platten aus. (Endoagar wurde gewählt, um schon optisch eine E. coli-Sepsis aufdecken zu können.) Nach 24stündiger Bebrütung bei 37° C bestimmte ich mit den spezifischen Immunsereen die Antigenstruktur der Kulturen.

Auf eine Messung des humoralen Antikörpertiters im Verlauf der Versuche habe ich verzichtet, da es ja schon lange bekannt ist, daß die Agglutininbildung nach oraler Immunisierung nur unregelmäßig und im geringen Grad nachzuweisen ist und in keinem Verhältnis zu der erreichten Immunität steht. (23, 29, 30, 42)

Orale Impfung mit hitzeinaktiviertem Impfstoff

Die folgenden Abbildungen 5, 6 und 7 entstanden jeweils durch die Zusammenfassung von drei Einzelversuchen. Sie zeigen die Schutzwirkung, die durch eine orale Immunisierung mit einem hitzeinaktivierten Impfstoff gegen eine spezifische intraperitoneale Infektion erreicht werden kann.

A. Orale Impfung mit hitzeinaktivierten S. newport

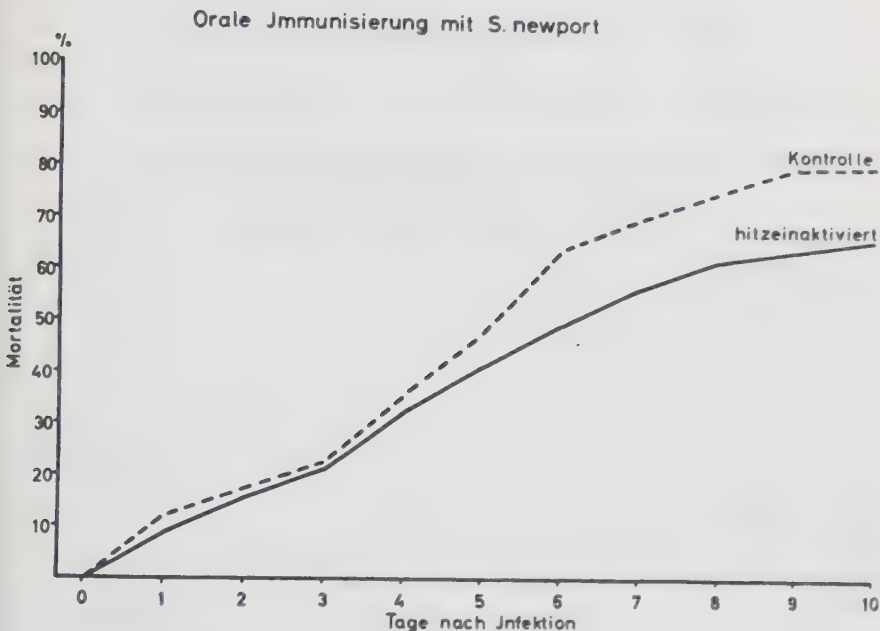


Abb. 5: Mortalität von 396 Versuchstieren.
(ausgezogene Linie : geimpfte Tiere
unterbrochene Linie : nicht geimpfte Tiere)

Die langsam ansteigende Absterbekurve der nicht geimpften Tiere, die typisch für eine Infektion mit S. newport und S. blockley ist, bildete sich auch bei den geimpften Tieren aus. In den ersten Tagen nach der Infektion war die Zahl der gestorbenen Tiere in beiden Gruppen fast gleich groß. Erst in der zweiten Hälfte des Versuchszeitraumes

lag die Mortalität bei den geimpften Tieren niedriger als bei den Kontrolltieren. Der Wirkungsindex, das heißt, die Differenz der Endmortalitäten in Prozent bei den geimpften und den nicht geimpften Tieren bezogen auf die Endmortalität in Prozent bei den Kontrolltieren, betrug 18,7.

B. Orale Impfung mit hitzeinaktivierten S. blockley

Orale Immunisierung mit S. blockley

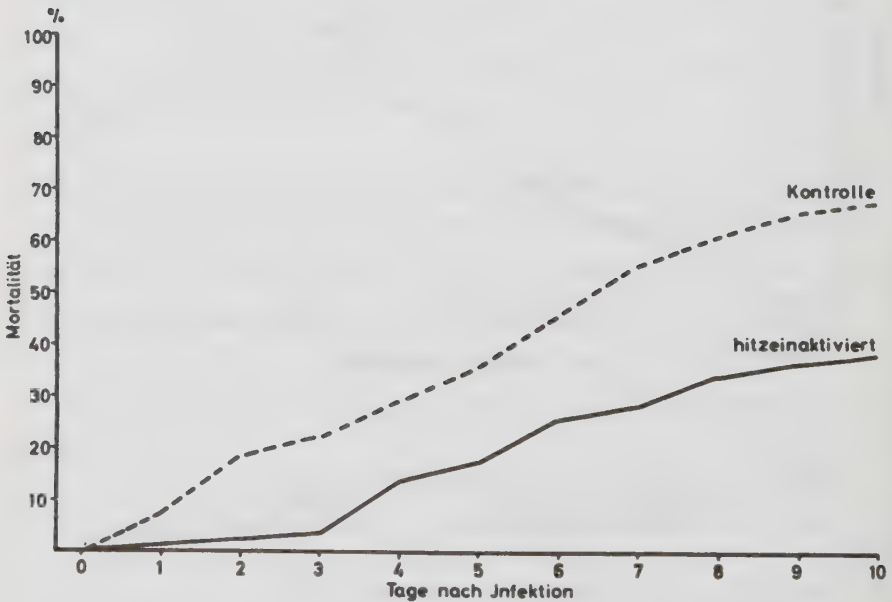


Abb. 6: Mortalität von 484 Tieren.

(ausgezogene Linie : geimpfte Tiere
unterbrochene Linie : nicht geimpfte Tiere)

Auch hier erzeugte die Infektion mit *S. blockley* bei beiden Tiergruppen langsam ansteigende Absterbekurven, die allerdings weitgehend parallel verliefen, da bis zum dritten Tag nach der Infektion nur ganz vereinzelt immunisierte Tiere starben. Der Wirkungsindex betrug 43,7.

C. Orale Impfung mit hitzeinaktivierten *S. schwarzengrund*

Orale Immunisierung mit *S. schwarzengrund*

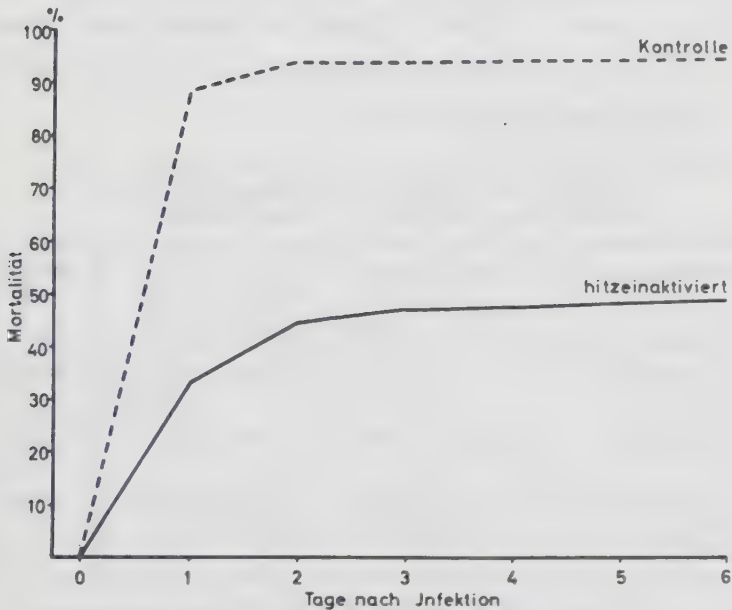


Abb. 7: Mortalität von 469 Versuchstieren.
(ausgezogene Linie : geimpfte Tiere
unterbrochene Linie : nicht geimpfte Tiere)

S. schwarzengrund ist ein Keim, der eine akute toxische Erkrankung erzeugt, der innerhalb kurzer Zeit fast alle infizierten Tiere erliegen.

Auch bei den geimpften Tieren war die Sterblichkeit in den ersten 48 Stunden am größten, danach starben nur noch ganz vereinzelt Tiere. Der Wirkungsindex der Impfung betrug 48,4.

Die statistische Sicherung der in den oben beschriebenen Versuchen aufgetretenen Endmortalitäten bei den geimpften Tieren ist in der Tab. 3 angegeben. Sie zeigt, daß die Mortalität der oral geimpften und der nicht geimpften Kontrolltiere in allen Versuchen statistisch signifikant voneinander abweicht. Den höchsten Echtheitsgrad zeigt S. schwarzengrund mit $E = 3,30$.

Tab. 3: Signifikanzberechnung der Unterschiede der Mortalität bei oraler Impfung mit hitzeinaktiviertem Impfstoff (nach KOLLER)

Impfung mit:	Endmortalität in %		Db	Dz	Db/DZ =E
	Versuch	Kontrolle			
S. newport (Abb. 5)	65,6	80,8	15,2	12,5	1,21
S. blockley (Abb. 6)	37,8	67,1	29,3	14,5	2,02
S. schwarzengrund (Abb. 7)	48,7	95,3	46,6	14,0	3,30

Orale Immunisierung mit hitzeinaktiviertem Impfstoff
und Tardolyt als Adjuvans

Die Abbildungen 8, 9 und 10 zeigen in graphischer Darstellung noch einmal die immunisierende Wirkung des hitzeinaktivierten Impfstoffes allein und dazu seine Wirkung bei gleichzeitiger Tardolytzufuhr, die sich, wie bereits erwähnt, anders als erwartet ausgewirkt hat, aber

selbst bei höherer Endmortalität noch eine statistische Sicherung des Immunisierungseffektes zeigt.

A. Orale Impfung mit hitzeinaktivierten S. newport bei gleichzeitiger Gabe von Tardolyt

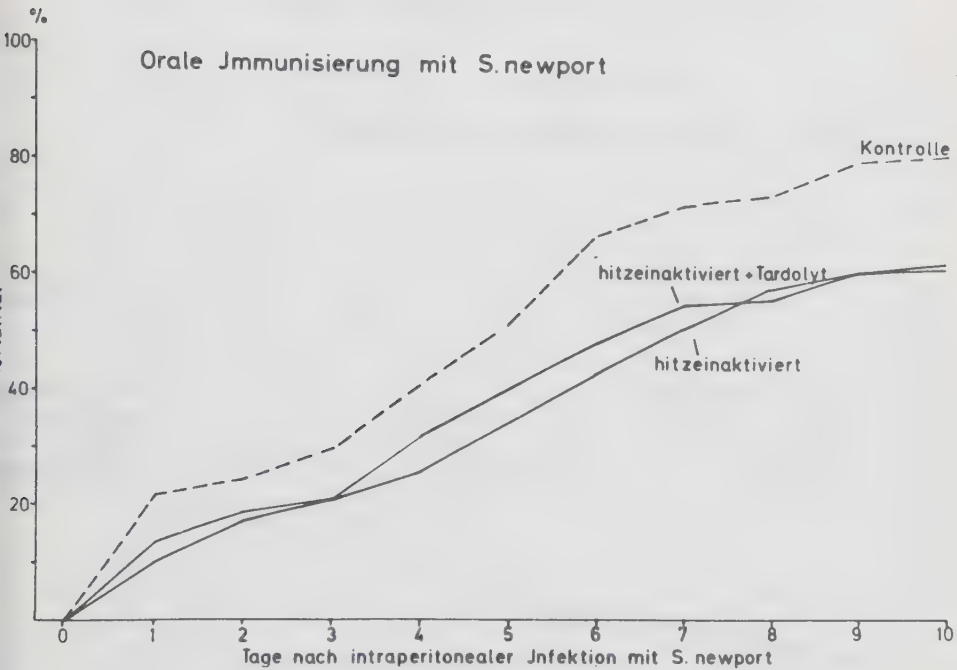


Abb. 8: Mortalität von 347 Versuchstieren.
(ausgezogene Linie : geimpfte Tiere bzw.
Impfung plus Tardolyt-
behandlung
unterbrochene Linie : nicht geimpfte Tiere)

Vom 3. bis 7. Versuchstage starben etwas mehr Tiere aus der zusätzlich mit Tardolyt behandelten Gruppe. Dafür erhöhte sich die Mortalität der einfach immunisierten Tiere

noch einmal gegen Versuchsende, so daß in der Endmortalität der beiden Gruppen ein Effekt der unterschiedlichen Behandlung nicht sichtbar wurde.

B. Orale Impfung mit hitzeinaktivierten S. blockley bei gleichzeitiger Gabe von Tardolyt

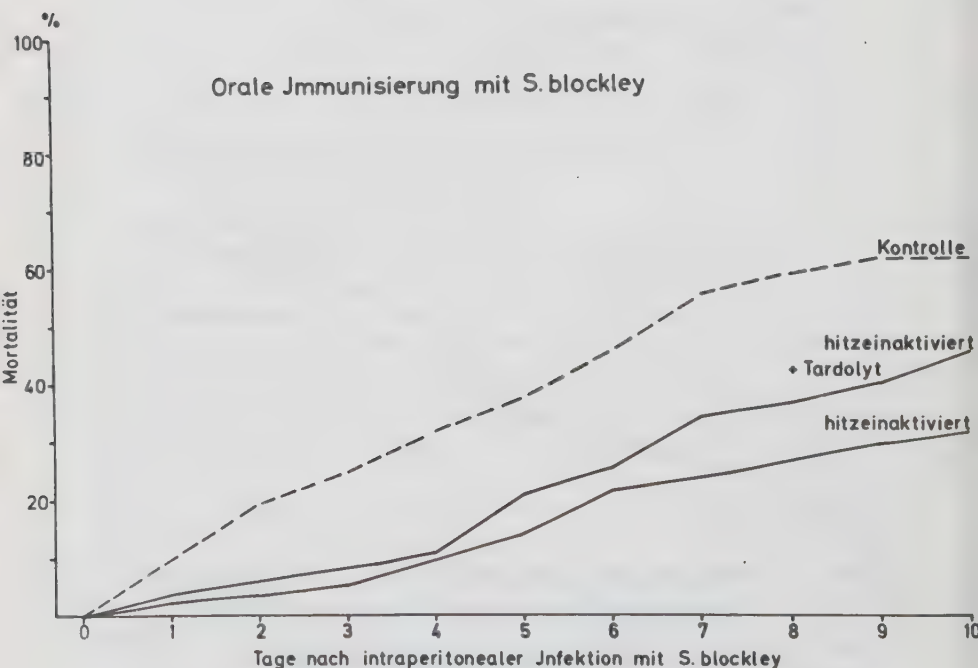


Abb. 9: Mortalität von 470 Versuchstieren.
 (ausgezogene Linie : geimpfte Tiere bzw.
 Impfung plus Tardolyt-
 behandlung
 unterbrochene Linie : nicht geimpfte Tiere)

Anders als bei der vergleichbaren Versuchsanordnung mit S. newport (Abb. 8) starben hier von Beginn an bis zum

Versuchsende mehr von den zusätzlich mit Tardolyt behandelten Tieren: Endmortalität = 45 %, als von den einfach immunisierten Tieren: Endmortalität = 32 %.

C. Orale Impfung mit hitzeinaktivierten S. schwarzengrund bei gleichzeitiger Gabe von Tardolyt

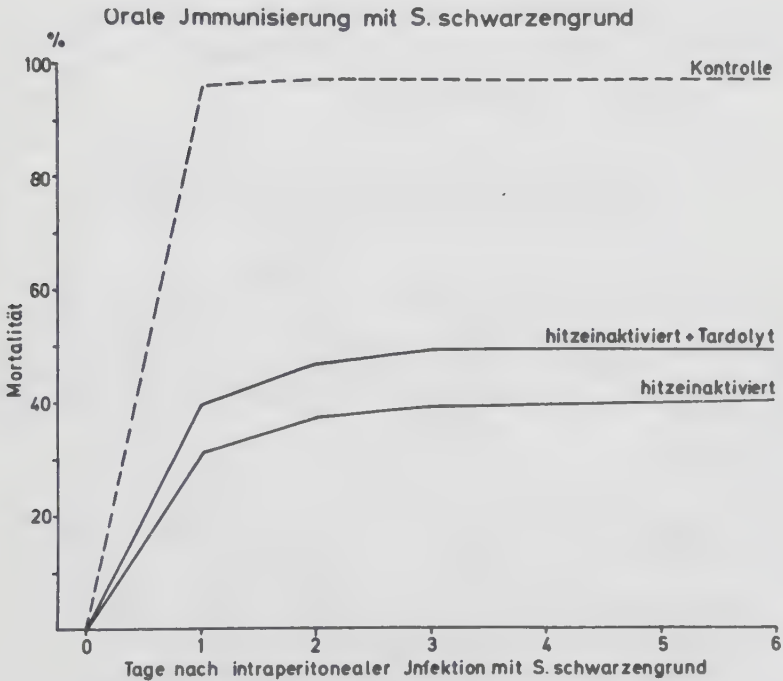


Abb. 10: Mortalität von 453 Versuchstieren.
(ausgezogene Linie : geimpfte Tiere bzw.
Impfung plus Tardolyt-
behandlung
unterbrochene Linie : nicht geimpfte Tiere)

Auch dieser Versuch ergab eine ganz ähnliche Erhöhung der Mortalität bei gleichzeitiger Tardolytzufuhr. Die

Endmortalität betrug 49 % gegenüber 40 %.

Die statistische Sicherung der Endmortalitäten aus dieser Versuchsanordnung mit Tardolyt als Adjuvans ist aus Tab. 4 zu ersehen. Darin zeigt sich, daß trotz der durch die Tardolytbehandlung zum Teil erhöhten Mortalität ein statistisch signifikanter Unterschied zur Mortalität der Kontrolltiere besteht. Außerdem bildete sich auch bei dieser Versuchsanordnung das gleiche Verhältnis der Echtheitswerte untereinander aus.

Tab. 4: Signifikanzberechnung der Unterschiede der Mortalität bei oraler Impfung mit hitzeinaktiviertem Impfstoff und gleichzeitiger Tardolytzufuhr

Impfung mit:	Endmortalität in %		Db	Dz	Db/Dz =E
	Versuch	Kontrolle			
S. newport (Abb. 8)	61,2	80,8	19,6	16,0	1,22
S. blockley (Abb. 9)	46,4	67,1	20,7	12,2	1,69
S. schwarzen- grund (Abb. 10)	49,0	95,3	46,3	15,8	2,93

Orale Impfung mit vermehrungsfähigen Bakterien

Die Abbildungen 11, 12 und 13 sind Darstellungen von Einzelversuchen mit jeweils etwa 250 Mäusen, in denen neben dem inaktivierten Impfstoff auch eine vermehrungsfähige Kultur als Impfstoff auf ihre immunisierende Wirkung geprüft wurde.

Abb. 14 ist eine Zusammenfassung von drei Versuchen derselben Anordnung mit S. heidelberg.

A. Orale Impfung mit vermehrungsfähigen S. newport

Orale Immunisierung mit S. newport

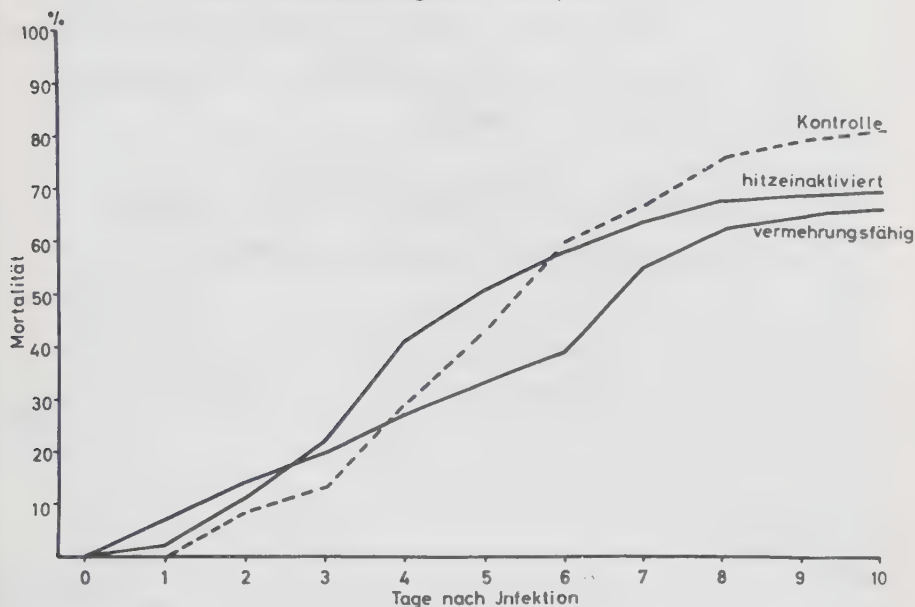


Abb. 11: Mortalität von 249 Versuchstieren.
(ausgezogene Linie: mit inaktiviertem Impfstoff geimpfte Tiere bzw. mit vermehrungsfähigem Impfstoff geimpfte Tiere.
unterbrochene Linie: nicht geimpfte Tiere)

Die Sterblichkeit lag zunächst bei den immunisierten Tieren höher als bei den Kontrolltieren, bis zum dritten Tag nach der Infektion am höchsten bei den mit vermehrungsfähiger Kultur behandelten Tieren. Dann war die Mortalität der mit inaktiviertem Impfstoff immunisierten Tiere am größten. Sie nahm erst am 6. Tag nach der Infektion ab, so daß am Ende des Versuches doch noch die Endmor-

talität bei den Kontrolltieren mit 82 % über der der geimpften Tiere mit 71 % bzw. 67 % lag.

Der Wirkungsindex des hitzeinaktivierten Impfstoffes betrug in diesem Einzelversuch mit *S. newport* nur 13,8 und wurde durch den des vermehrungsfähigen Impfstoffes mit 18,6 nur um wenig überboten.

B. Orale Impfung mit vermehrungsfähigen *S. blockley*

Orale Immunisierung mit *S. blockley*

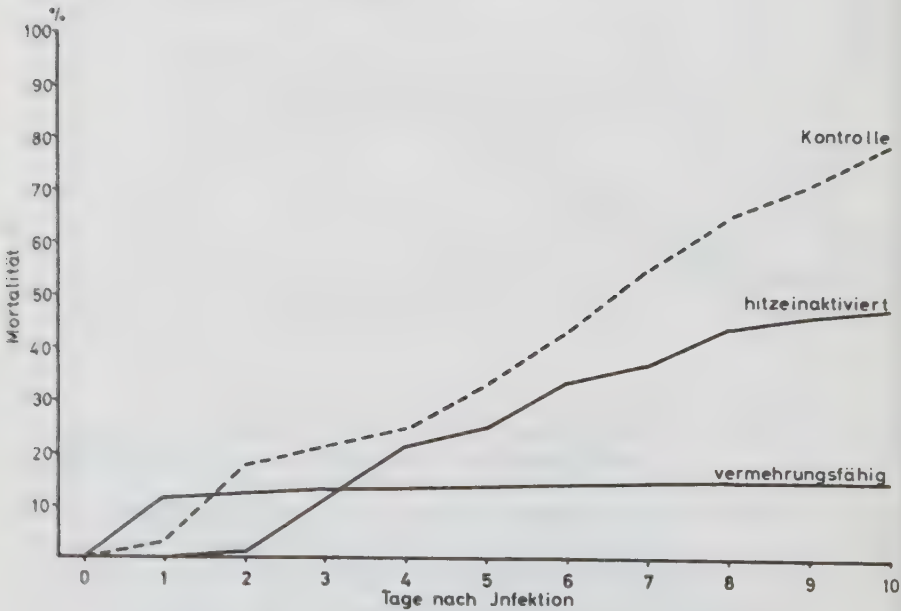


Abb. 12: Mortalität von 246 Versuchstieren.
(ausgezogene Linie: mit inaktiviertem Impfstoff geimpfte Tiere bzw. mit vermehrungsfähigem Impfstoff geimpfte Tiere.
unterbrochene Linie: nicht geimpfte Tiere)

Die Absterbekurve der Kontrolltiere und der mit inaktiviertem Impfstoff geimpften Tiere verliefen ganz ähnlich denen, die sich aus den anderen Versuchsanordnungen mit *S. blockley* (Abb. 6 und 9) ergeben hatten. Die Absterbekurve der mit vermehrungsfähigem Impfstoff behandelten Tiere ist dagegen eine Kurve, die man zum Beispiel nach einer Infektion mit *S. schwarzengrund* erwarten würde. Die Sterblichkeit war innerhalb der ersten 24 Stunden am größten. Sie lag dabei über der der Kontrolltiere. Danach starben nur noch wenige Tiere. Der resultierende Wirkungsindex von 82,2 wurde in dieser Größe nur noch in den Versuchen mit *S. heidelberg* erreicht.

C. Orale Impfung mit vermehrungsfähigen S. schwarzengrund

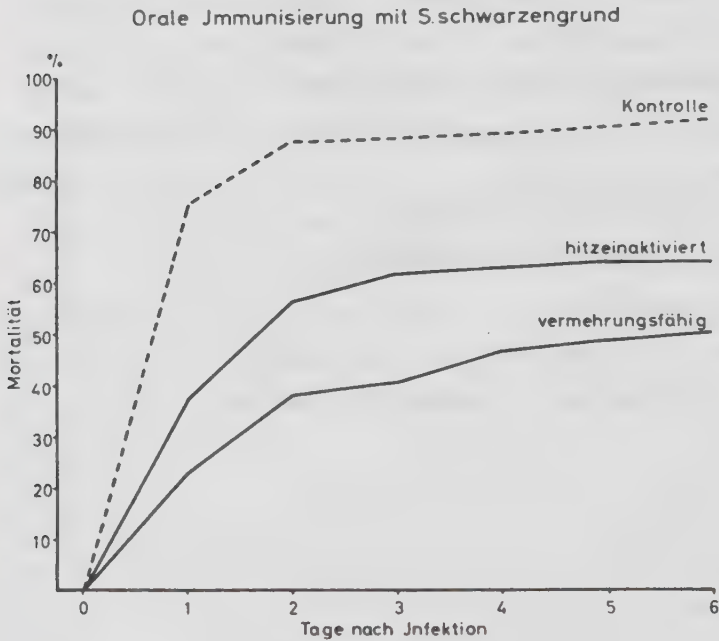


Abb. 13: Mortalität von 247 Versuchstieren.
(ausgezogene Linie : mit inaktiviertem Impfstoff geimpfte Tiere bzw. mit vermehrungsfähigem Impfstoff geimpfte Tiere.
unterbrochene Linie: nicht geimpfte Tiere)

In diesem Versuch konnte eine immunisierende Wirkung des inaktivierten Impfstoffes von dem Ausmaß, das sich in anderen Versuchen mit S. schwarzengrund (Abb. 7 und 10) ergeben hatte, nicht erreicht werden. Die Endmortalität lag hier bei 64 %, das entspricht einem Wirkungsindex von 30,2.

Bei den mit einer vermehrungsfähigen Kultur geimpften Tieren, war die Sterblichkeit durchgehend am niedrigsten. Aber auch dieser Wirkungsindex von 47,5 liegt noch unter demjenigen, der in den oben angeführten Versuchen mit inaktiviertem Impfstoff erreicht wurde.

D. Orale Impfung mit vermehrungsfähigen S. heidelberg

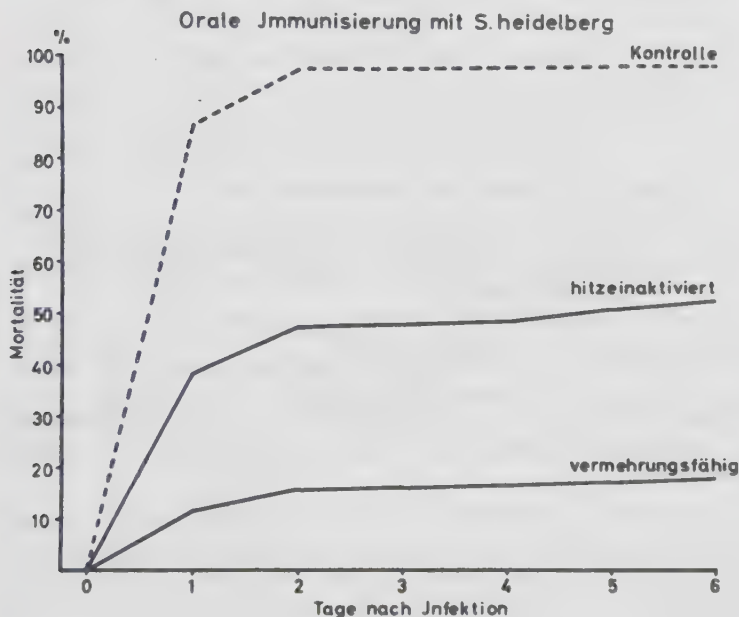


Abb. 14: Mortalität von 749 Versuchstieren.
(ausgezogene Linie : mit inaktiviertem Impfstoff geimpfte Tiere bzw. mit vermehrungsfähigem Impfstoff geimpfte Tiere.
unterbrochene Linie: nicht geimpfte Tiere)

Die Absterbekurven der beiden immunisierten Tiergruppen sind beinahe ideale Abbilder der Absterbekurve der unbehandelten Tiere. Nur war der Anteil an der Sterblich-

keit von Anfang an wesentlich geringer. Bezogen auf die hohe Endmortalität der Kontrolltiere von 98 % ergab sich nach oraler Immunisierung mit inaktiviertem Impfstoff ein Wirkungsindex von 46,6, das entspricht einer statistischen Sicherung von $E = 3,4$ gegenüber der Endmortalität bei den Kontrolltieren. Der Wirkungsindex bei Verwendung von vermehrungsfähigem Impfstoff betrug 81,4. Die in Tabelle 5 aufgeführten Echtheitswerte ergeben wiederum in allen Fällen eine statistische Sicherung der Endmortalitäten bei den geimpften Tieren, mit dem überragenden Echtheitswert von $E = 8,26$ für eine orale Impfung mit einer vermehrungsfähigen Kultur von *S. heidelberg*.

Tab. 5: Signifikanzberechnung der Unterschiede der Mortalität bei oraler Impfung mit vermehrungsfähigem Impfstoff

Impfung mit:	Endmortalität in % Versuch Kontrolle		Db	Dz	Db/Dz =E
<i>S. newport</i> (Abb. 11)	66,6	80,8	14,2	10,0	1,42
<i>S. blockley</i> (Abb. 12)	13,9	67,1	53,2	17,0	3,13
<i>S. schwarzen- grund</i> (Abb. 13)	50,0	95,3	45,3	18,8	2,41
<i>S. heidelberg</i> (Abb. 14)	18,3	98,4	80,1	9,7	8,26

Zusammenfassend läßt sich über diese Versuche zur oralen Immunisierung an insgesamt 2 760 Mäusen sagen:

1. Durch eine spezifisch orale Immunisierung kann die Endmortalität bei den geimpften Tieren gegenüber der bei den Kontrolltieren gesenkt werden,

2. der erreichte Impfschutz ist bei oraler Immunisierung mit vermehrungsfähigem Impfstoff besser als bei Verwendung von inaktiviertem Impfstoff.

Bei einer Beurteilung des erreichten Impfschutzes in den einzelnen Versuchen am Vergleich der Endmortalität bei den geimpften Tieren und den Kontrolltieren zeigt sich der Wert der oralen Immunisierung. Für *S. newport* erwies sie sich am wenigsten wirksam, im ungünstigsten Fall hatte sie bei der Verwendung von inaktiviertem Impfstoff nur einen Wirkungsindex von 13,8 (Abb. 11).

Die Versuche mit *S. heidelberg*, *S. schwarzengrund* und *S. blockley* erbringen aber den unzweifelhaften Beweis einer erfolgreichen oralen Impfung. Die geimpften Tiere haben eine fast doppelt so hohe Widerstandsfähigkeit gegen spezifische intraperitoneale Infektionen wie die Kontrolltiere. Bei Immunisierung mit vermehrungsfähigem Impfstoff steigt sie zum Teil auf das 4 bis 5fache.

Dabei sollte berücksichtigt werden, daß es galt, eine Immunität gegen virulente Keime mit hoher Endmortalität von 80 % bzw. 100 % aufzubauen. Außerdem ist die intraperitoneale Infektion eine unphysiologische Belastung, da es zu einer direkten Überschwemmung der Blutbahn mit Erregern unter Umgehung des durch die orale Immunisierung aufgebauten lokalen Impfschutzes des Darmepithels kommt.

Der Versuch, das zunächst schnellere Absterben der immunisierten Tiere in den Versuchen mit *S. newport* und *S. blockley* (Abb. 11 und 12) zu erklären, ist damit belastet, daß es sich hier um Befunde aus Einzelversuchen mit einer nur geringen Anzahl von Versuchstieren handelt. Befunde übrigens, die sich in zwei anderen, zeitlich voneinander getrennten Versuchen nicht ergaben. Interkurrente Krankheiten der immunisierten Tiere, die zu der experimentellen Infektion hinzugekommen wären, können ausgeschlossen werden, da die Sterblichkeit vor der Infektion insgesamt unter 5 ‰ lag. Die negativen Einflüsse des Tardolyts möchte ich später zusammen mit der Begründung des Tardolyteinsatzes besprechen.

S. schwarzengrund

Tab. 6: Statistische Zusammenfassung aller Versuche mit S. schwarzengrund

Versuch Nr.	Hitzeinaktivierte Kultur A			Vermehrungsfähige Kultur B			Hitzeinaktivierte Kultur u. Tardolyt C			Kontrolle			Wirkungsindex		
	n	+	%	n	+	%	n	+	%	n	+	%	A	B	C
1	71	19	26.76	-	-	-	70	25	35.71	72	68	94.79	71.6	-	62.1
2	80	42	52.50	-	-	-	79	48	60.77	81	81	100.00	47.5	-	39.2
3	83	53	63.85	82	41	50.00	-	-	-	82	75	91.46	30.2	45.3	-
Gesamt	234	114	48.72	82	41	50.00	149	73	49.00	235	224	95.31	48.4	47.5	48.6

n = Zahl der Tiere

+ = Zahl der gestorbenen
Tiere nach Infektion

% = Endmortalität in %

S. newport

Tabelle 7: Statistische Zusammenfassung aller Versuche mit S. newport

Versuche Nr.	Hitzeinaktivierte Kultur A		Vermehrungsfähige Kultur B		Hitzeinaktivierte Kultur u. Tardolyt C		Kontrolle		Wirkungsindex	
	n	+	n	+	n	+	n	+	A	B C
4	82	52	-	-	82	51	82	65	19.88	- 21.42
5	34	20	-	-	34	20	33	27	27.92	- 27.92
6	82	58	84	56	-	-	83	68	13.79	18.62 -
Gesamt	198	130	84	56	116	71	198	160	18.75	17.5 24.1

n = Zahl der Tiere

+ = Zahl der gestorbenen Tiere nach Infektion

% = Endmortalität in %

S. blockley

Tab. 8: Statistische Zusammenfassung aller
Versuche mit S. blockley

Versuch Nr.	Hitzeinaktivierte Kultur A		Vermehrungsfähige Kultur B		Hitzeinaktivierte Kultur u. Tardolyt C		Kontrolle		Wirkungsindex		
	n	+	n	+	n	+	n	+	A	B	C
7	84	58	45.23	-	-	-	86	68	79.06	42.78	-
8	72	13	18.05	-	-	-	75	31	41.33	56.31	-
9	85	40	47.05	79	11	13.91	82	64	78.04	39.83	82.17
Gesamt	241	91	37.76	79	11	13.91	243	163	67.07	43.69	79.25
											30.80

n = Zahl der Tiere

+ = Zahl der gestorbenen
Tiere nach Infektion

% = Endmortalität in %

Versuch Nr.	Hitzeinaktivierte Kultur A		Vermehrungsfähige Kultur B		Kontrolle		Wirkungsindex	
	n	+	%	n	+	%	A	B
10	79	36	53.14	83	9	10.84	46.86	89.16
11	85	59	69.41	83	31	37.34	29.82	62.20
12	84	35	42.46	85	6	7.09	55.95	92.64
Gesamt	248	130	52.41	251	46	18.32	46.63	81.38

n = Zahl der Tiere

+ = Zahl der gestorbenen
Tiere nach Infektion

% = Endmortalität in %

Diskussion

Die Überlegenheit des nicht inaktivierten Impfstoffes, die sich in den Versuchen gezeigt hat, verweist auf das Problem der Impfstoffherstellung. Von einem guten Impfstoff verlangt man, daß er dem Geimpften einen möglichst hohen Schutz gegen folgende Infektionskrankheiten gibt, und daß er von gleichbleibendem Wert ist.

Den gleichbleibenden Wert habe ich versucht zu erreichen, indem ich die Herstellung des Impfstoffes in allen Versuchen unverändert durchgeführt habe. Bei dem hier angewandten Verfahren der Hitzeinaktivierung kann der Wert außerdem noch quantitativ durch Keimzählung und folgende Keimzahleinstellung sichergestellt werden.

Die Höhe des Schutzes ist von der Intaktheit des Antigens abhängig. Deshalb wäre die denkbar schonendste Aufbereitung des Antigens wünschenswert. Leider bedeutet aber jede physikalische und chemische Beeinflussung mit dem Ziel, seine krankmachenden Eigenschaften auszuschalten, auch gleichzeitig eine mehr oder weniger starke Beeinflussung seiner antigenen Potenz.

In der Literatur ist eine große Vielzahl von Methoden für eine Impfstoffherstellung aus *S. typhi* angegeben (11). Aber gerade diese Vielzahl an Möglichkeiten zeigt, daß man auch heute, da die Träger der immunisatorischen Wirkung bekannt sind, noch nicht die ideale Impfstoff-

herstellung gefunden hat. Deshalb habe ich für diese ersten orientierenden Tierversuche über die Möglichkeit einer oralen Immunisierung gegen Enteritis-Salmonellen die technisch einfache und unkomplizierte Inaktivierung durch Erhitzen gewählt. Sie wurde bereits 1896 von PFEIFFER und KOLLE verwandt, um einen brauchbaren Impfstoff gegen Typhus abdominalis zu erhalten (24). Ihren unveränderten Wert hat sie fast 60 Jahre später 1954/55 in einem großangelegten Feldversuch in Jugoslawien bewiesen (8).

Die von FELIX gegen die Hitzeinaktivierung zur Impfstoffherstellung vorgebrachten Bedenken (7) brauchen hier nicht berücksichtigt werden, da die geprüften Enteritis-Salmonellen kein hitzelabiles Vi-Antigen besitzen.

Aber auch für diese Methode gilt das oben über die Beeinflussung der Antigenstruktur Gesagte.

Dabei läßt sich nach der thermischen Abtötung im Reagenzglas mit den entsprechenden Faktorensérern sicher eine erhaltengebliebene Antigenstruktur nachweisen.

Diese Analyse ist aber zu wenig empfindlich, um das gesamte Spektrum des antigenen Aufbaus zu überprüfen.

Und so muß vermutet werden, daß es doch nicht mehr so breit und so vollkommen wirkt. Dazu kommt noch die fehlende Penetration der abgetöteten Bakterien. Ihre Aufnahme erfolgt passiv durch das Epithel des Magen-Darmtraktes, entsprechend der allgemeinen Resorption von

Antigenen. Das hieße, daß die lebenden Bakterien durch ihre Fähigkeit zur Penetration neben der Resorption möglicherweise durch das daraus resultierende größere Antigenangebot an das antikörperbildende System eine bessere immunisierende Wirkung haben.

J.R. MÖSE wies 1963 auf die Möglichkeit hin, den Verlauf bakterieller Infektionen durch eine Substanz, die aus der Osterluzei (*Aristolochia clematitis*) gewonnen werden konnte, zu beeinflussen (18,19).

Diese Substanz, die Aristolochiasäure oder Tardolyt, eine 3,4-Methylendioxy-10-Nitro-phenanthrencarbonsäure, bewirkte in vitro eine Steigerung der Phagocytoseaktivität der Leukocyten. In Tierversuchen an der weißen Maus und Ratte wurde dieser Effekt bei experimentell erzeugten Infektionen erprobt. Sowohl nach parenteraler als auch nach oraler Zufuhr von Tardolyt ergab sich eine Steigerung der Phagocytoseaktivität und eine deutliche Steigerung der baktericiden Wirkung des Serums, die eine verlängerte Überlebenszeit, zum Teil auch Ausheilung bzw. an künstlich gesetzten und infizierten Wunden Abheilung bewirkten.

Auch mit *S. typhi-murium* wurden Versuche an der weißen Maus durchgeführt, bei denen allerdings nur eine Verlängerung der Überlebenszeit beobachtet werden konnte.

Ich entschloß mich also zu einer Tardolytbehandlung zusätzlich zu dem oral applizierten inaktivierten Impf-

stoff in der Vorstellung, dadurch eine Unterstützung der spezifischen Immunisierung durch die Steigerung der unspezifischen Abwehr zu erhalten. Außerdem wollte ich die weniger günstigen Ergebnisse für *S. typhi-murium* nicht ohne weiteres auf die in meinen Versuchen verwendeten Enteritis-Salmonellen übertragen, da *S. typhi-murium* ein Keim ist, der anders als die Enteritis-Salmonellen bei oraler Zufuhr hochpathogen für die Maus ist.

Für die in den Versuchen aufgetretene Verringerung des Impfschutzes bei gleichzeitiger Tardolytzufuhr können hier nur Mutmaßungen geäußert werden. Eine grundlegende Beweisführung war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Zu erwägen wäre, ob nicht das zweimal am Tag vorgenommene Einführen der Schlundsonde für die Tiere eine größere Belastung und damit Schwächung bedeutet hat. Jede Fütterung durch die Sonde ist allerdings so schonend wie möglich gehandhabt worden. Dabei ist es nie zu Verletzungen, die sich in einer Blutung gezeigt hätten, gekommen, die sich andererseits bei einem Spritzenwechsel bei liegender Sonde am unbetäubten Tier bestimmt ergeben hätten.

Bei diesen theoretischen Überlegungen müssen auch mögliche Auswirkungen des Tardolyts selber erwähnt werden. Zum Beispiel eine Einflußnahme auf die Antigenstruktur der gleichzeitig zugeführten Mikroorganismen oder ein direktes Eingreifen des Tardolyts in die Eiweißsynthese im Sinne einer Hemmung.

J.R. MOSE beobachtete eine Zunahme der Phagocytoseaktivität bereits kurz nach der ersten Tardolytgabe. Er setzte die Infektion direkt anschließend an die letzte Tardolytzufuhr, bzw. begann mit dieser Therapie erst nach der Infektion. Das bedeutet, daß in meiner Versuchsanordnung der 10tägigen Impfstoff-Tardolytzufuhr die gesteigerte Phagocytose sich bereits während der Zeit der Immunisierung positiv auswirken konnte, indem dadurch vermehrt Antigen in Kontakt mit den Zellen des RES gebracht wurden. Andererseits könnte man annehmen, daß die positiven Effekte auf die unspezifischen Abwehrkräfte in der 8-10 Tage währenden Pause nach der letzten Impfung bereits wieder abgeklungen sind und, daß der Zeit der Stimulation eine Phase folgt, in der selbst diejenige Steigerung ausbleibt, die sich in jedem normal reagierenden Organismus bei einer Infektion entwickelt.

Seit den ersten Versuchen zur oralen Immunisierung ist die Frage nach der Art der erworbenen Immunität eine Streitfrage gewesen.

LOEFFLER, der 1906 Mäuse oral immunisierte und oral infizierte, hielt sie für eine ausschließlich lokale Immunität, die das Darmepithel durch den Kontakt mit dem Impfstoff erworben hatte und damit die Invasion der Erreger bereits an der Eintrittspforte abhing, ohne daß es zu einer Resorption des Antigens kommt (17).

BESREDKA (1) glaubte ebenfalls an die Ausbildung einer lokalen Immunität, die er als "eine Art Gewöhnungszustand der empfänglichen Zellen an die Bakterien" auffaßte. Allerdings hat er diese Meinung experimentell nicht belegen können. Im Gegensatz dazu stehen andere Untersucher, die bereits 1911, 1924 und 1926 durch ihre spezielle Versuchsanordnung auf die Resorption des Antigens und die Entstehung einer allgemeinen Immunität schlossen (2, 16, 34).

Ähnliches trifft auch für meine Versuche zu. Gerade weil ich das physiologische Modell der Belastung einer oralen Immunisierung durch eine orale Infektion nicht übernehmen konnte, sondern die erworbene Immunität durch eine parenterale Infektion belasten mußte, spricht die Tatsache, daß ein zum Teil hochwertiger Schutz gegen die intraperitoneale Infektion vorhanden war, für eine Resorption des Antigens. Eine Resorption, die die Voraussetzung für den Kontakt des Antigens mit den Zellen des antikörperbildenden Systems, besonders mit den Plasmazellen ist, und damit für die Bildung spezifischer Antikörper. Eine allerdings lokale, zellgebundene Immunität der Magen-Darmschleimhaut hätte auf die parenterale Infektion keinen Einfluß nehmen können.

In der Tat haben Untersuchungen von MEWES und PASQUIER durch Verwendung von Bakterien, die mit radioaktiven Substanzen markiert waren, eine Resorption nachweisen können, die bereits wenige Minuten nach der oralen Zu-

fuhr beginnt (17a, 22, 33).

Die Antikörperbildung nach oraler Immunisierung zeichnet sich durch eine Eigenart aus, die schon früher bekannt war. Im Gegensatz zur parenteralen Impfung kann nur ein niedriger Antikörpertiter im Serum nachgewiesen werden. Das ist eine Tatsache, die wohl mit ein Grund dafür ist, daß die orale Immunisierung bei allen nachweislichen Vorteilen in einer Zeit, in der das Meßbare und durch Zahlen Belegbare hoch bewertet wird, nicht die Beachtung und Nutzung gefunden hat, die ihr gebührt.

Es wird dabei übersehen, daß das antikörperbildende System durch die orale Immunisierung das Vermögen zur Antikörperbildung erworben hat und bei jeder homologen Infektion mit einer schnellen Antikörperausschüttung reagiert (23, 30, 42). "Nicht die im strömenden Blut meßbaren Antikörper zeigen den Grad der Immunität an, sondern das Antikörperbildungsvermögen repräsentiert einen Teil der Immunität." (RAETTIG)

Ich möchte zum Schluß noch einmal die Vorteile zusammenstellen, die die Durchführung der oralen Impfung gegenüber der parenteralen Impfung bei bakteriellen Darminfektionen bietet.

1. Es kommt zur Ausbildung einer lokalen und einer allgemeinen Immunität. Das ist eine besonders günstige Kombination, da durch die lokale Immunität eine Infektion bereits an der Eintrittspforte abgefangen

werden kann. Daraus resultiert eine Senkung der Morbidität. Die allgemeine Immunität, die auch durch eine parenterale Impfung erworben wird, mildert und kürzt den Verlauf einer klinisch manifest gewordenen Krankheit und senkt die Letalität.

2. Schnellerer Wirkungseintritt.
3. Einfachere Organisation bei Massenimpfungen.
4. Keine Provokation einer Krankheit nach oraler Impfung in die Inkubation mit Verkürzung der Inkubationszeit, schwerem klinischen Verlauf und erhöhter Letalität, während dies bei parenteraler Impfung zu befürchten ist (14, 26, 27).

Gerade diese letzten Punkte machen die orale Impfung zur Therapie der Wahl im Katastrophenfall, bei Epidemien und speziell bei Endemien innerhalb geschlossener Anstalten.

Zusammenfassung

Die zwölf häufigsten menschenpathogenen Enteritis erzeugenden Salmonellentypen in Deutschland wurden auf ihre Mäusepathogenität geprüft. Sie erzeugen nach oraler Gabe bei der Maus keine Krankheit, dagegen nach intraperitonealer Applikation. Um einen Impfschutz nachweisen zu können, müssen die Tiere also intraperitoneal infiziert werden.

Von den zwölf geprüften Salmonellentypen wurden die vier Keime mit der höchsten Mäusepathogenität für die Impfversuche gewählt. Nach oraler Immunisierung mit hitzeinaktivierten Salmonellen sind die Tiere signifikant gegenüber der intraperitonealen Infektion geschützt. Der Schutz kann verbessert werden, wenn statt hitzeinaktivierten vermehrungsfähige Salmonellen oral gegeben werden. Eine Zugabe von Tardolyt zum Impfstoff als Adjuvans verbessert den Impferfolg nicht.

Die Versuche zeigen, daß entgegen früheren Annahmen die orale Impfung auch gegenüber einer parenteralen Infektion zu schützen vermag. Die orale Impfung vermittelt also eine allgemeine Immunitätsreaktion.

Der Wert der Tierversuche für eine Immunprophylaxe des Menschen wird diskutiert.

Literaturverzeichnis

1. Besredka, A.: Die lokale Immunisierung.
1926, Leipzig, Verlag von Johann Ambrosius Barth
2. Bruckner, G.: Über orale Immunisierungsversuche.
Zschr. f. Immunföschg. 8, 439, 1911
3. Bundesgesundheitsblatt 1958-1965, 1.-8. Jahrgang
4. De Mello, F., Suctancar, B.: Infection et immunité des pigeons et des souris blanches vis-à-vis du bacille paratyphique B.
Compt. rend Soc. Biol. 101, 393, 1929
5. Domingo, P.: Sur l'immunisation antityphoidique par voie buccale.
Compt. rend. Soc. Biol. 110, 733, 1932
6. Domingo, P.: Über Typhusimmunisierung durch perorale Verabreichung.
Rev. med. Barcelona 17, 327, 1932
7. Felix, A.: The Preparation, Testing and Standardization of Typhoid Vaccines.
J. Hyg. 42, 268, 1951
8. Field and Laboratory Studies with Typhoid Vaccines.
Bull. W.H.O. 16, 897, 1957
9. Fränkel, E.: Perorale Typhus-Immunisierung.
Med. Welt 1927, 939
10. Fränkel, E.: Über den gegenwärtigen Stand der peroralen Immunisierungsmethoden.
Med. Klinik 1927, 157
11. Günther, O.: Schutzimpfung gegen bakterielle Darminfektionen.
In: Herrlich, A.: Handbuch der Schutzimpfungen. Springer-Verlag, 1965, 542

12. Hofmann, S., Rohde, R., Seeliger, H.P.R.: Salmonel-
losen in der Bundesrepublik Deutschland und
West-Berlin 1959.
Bundesgesundheitsblatt, 6. Jahrgang, 1963,
Nr. 23, 361
13. Hofmann, S., Rohde, R., Seeliger, H.P.R.: Salmonello-
sen in der Bundesrepublik Deutschland und
West-Berlin 1962.
Noch nicht veröffentlicht.
14. Katsch, G.: Bauchtyphus 1945.
Zschr. f.d. ges. Innere Medizin Jg. 1, 1946,3
15. Kosmodemjanski, W.N.: Vakzination per os gegen den
Paratyphus B.
Zschr. f. Immunfischg. 64, 16, 1929
16. Lange, B., Yoshioka, M.: Beobachtungen über Infektion
und Immunität beim Mäusetyphus.
Zschr. d. Hyg. 101, 451, 1924
17. Loeffler, F.: Über die Immunisierung per os.
v. Leuthold-Gedenkschrift I, 247, 1906
- 17a. Mewes, M.: Aufnahme und Verteilung von radiomarkier-
tem Antigen von *S. typhi-murium* in der Maus
bei oraler, rectaler und subcutaner Anwendung.
Inaug. Diss. 1966, Berlin F.U.
18. Möse, J.R.: Versuche über die Wirksamkeit von Aristo-
lochiasäure.
Planta Medica 11, 72-91, 1963
19. Möse, J.R.: Zur Beeinflussung der Infektabwehr durch
Aristolochiasäure.
Zbl. f. Bakt. I Ref. 188, 475, 1963
20. Morbidity and Mortality. Vol. 14, Nr. 46, November 20,
1965, 395
21. Ottolenghi, D., Brotzu, G.: Untersuchungen über die
orale Typhus- und Paratyphus-B-Impfung.
Zschr. f. Immunfischg. 65, 195, 1930

22. Pasquier, F.J.: Etude, chez la souris, de la distribution et de l'élimination de bacilles typhiques et paratyphiques A et B tués, marqués au Carbone 14, administrés par ingestion.
Annales de L'Institut Pasteur, Nr. 4. Oktober 1965, 499
23. Petrov, M.: Zur Antikörperbildung bei der Darmvaccination.
Vestn. Microbiol. 8, 419 -
französische Zusammenfassung - 432, 1929
24. Pfeiffer, R., Kolle, W.: Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Schutzimpfung des Menschen gegen Typhus abdominalis.
Dtsch. Med. Wschr. 22, 735, 1896
25. Raettig, H.J.: Erfahrungen und vergleichende Betrachtungen über die Erfolge der parenteralen und peroralen Typhusschutzimpfung.
Zschr. f. Immunfshg. 108, 1950, 165 (2)
26. Raettig, H.J.: Wann sollen die Schutzimpfungen gegen Typhus vorgenommen werden.
Dtsch. med. Wschr. 79, 1954, 173 (5)
27. Raettig, H.J.: Provokation einer Infektion durch Schutzimpfung.
Zbl. f. Bakt. Orig. 174, 1959, 192
28. Raettig, H.J.: Tierexperimente zur oralen Immunisierung mit inaktiviertem Antigen.
Zbl. f. Bakt. I Orig. 182, 525, 1961
29. Raettig, H.J.: Die lokale Immunisierung mit inaktiviertem Antigen gegen bakterielle Darminfektionen (Typhus, Paratyphus, Cholera, Ruhr).
Zb. f. Bakt. I. Ref. 183, 1962, 1
30. Raettig, H.J.: Die aktive Immunisierung, gestern, heute und morgen.
Wiener Med. Wschr. 113, 1963, 366

31. Raettig, H.J.: Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen.
Zbl. f. Bakt. I Orig. 193, 1964, 398 (3)
32. Raettig, H.J.: Gedanken zu Schutzimpfungen im Katastrophenfall.
Der öffentliche Gesundheitsdienst 27, 1965, 131
33. Raettig, H.J.: Neues zur Wirkungsweise der oralen Immunisierung.
Wiener Med. Wschr. 115, 1965, 33
34. Reiter, H.: Versuche über perorale Immunisierung.
Dtsch. med. Wschr. 1926, 946
35. Rohde, R., Seeliger, H.P.R., Hofmann, S., Bulling, E.: Jahresbericht 1960 und 1961 über die Salmonellosen in der Bundesrepublik Deutschland einschließlich Berlin-West.
Arch. f. Hygiene 149, 1965
36. Schmidt, E.F.: Salmonella- und Shigella-Enteritis.
In: Säuglingsenteritis. A. Adam. Thieme-Verlag, Stuttgart.
37. Schmidt, F.: Der heutige Stand der peroralen Typhusimmunisierung.
Zschr. f. Med. Beamte 1931, 445
38. Seeliger, H.P.R.: Salmonellosen in Deutschland 1953-1955.
Arch. f. Hygiene, 140, 1956, 499
39. Seeliger, H.P.R.: Salmonellosen in der Deutschen Bundesrepublik und West-Berlin 1957.
Zbl. f. Bakt. Ref. 169, 1958, 193
40. Seeliger, H.P.R., Hofmann, S., Rohde, R.: Salmonellosen in der Bundesrepublik Deutschland und West-Berlin 1958.
Zbl. f. Bakt. 182, 1961, 357

41. Seeliger, H.P.R.: Epidemiologie der Salmonellosen in Europa, 1950-1960.
In: E. van Oey: The World Problem of Salmonellosis.
Dr. W. Junk - Publishers - The Hague - 1964
42. Torikata, R., Imaizumi, H.: Zum Unterschied zwischen der Injektions- und der oralen Immunisierung.
Zschr. f. Immunföschg. 94, 1938, 342

Herrn Professor Dr. R a e t t i g danke ich
herzlich für die Überlassung des Themas und
die lebenswürdige Unterstützung bei der Arbeit.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern seiner
Abteilung, besonders der Medizinisch-Technischen
Assistentin Präulein Gisela M ü l l e r .

L e b e n s l a u f

Am 22. September 1941 wurde ich, Evamaria Kinne, als Tochter des Ingenieurs Anton Saffran und seiner Ehefrau Paula geb. Vogelsang in Berlin geboren.

Von 1947 bis 1951 ging ich in Berlin zur Grundschule. Bis zur Reifeprüfung im Frühjahr 1960 besuchte ich eine Oberschule Wissenschaftlichen Zweiges in Berlin.

Am 23. Mai 1960 schrieb ich mich an der Philosophischen Fakultät der Freien Universität Berlin ein. Im November 1960 wechselte ich zur Medizinischen Fakultät über. Nach dem Wintersemester 1962/63 bestand ich die ärztliche Vorprüfung und im Sommer 1966 das ärztliche Staatsexamen.

Von Dezember 1966 bis März 1967 war ich als Medizinalassistentin auf der Gynäkologischen und Geburtshilflichen Abteilung der Städtischen Frauenklinik Am Mariendorfer Weg in Berlin tätig. Seit April 1967 arbeite ich an der II. Inneren Klinik des Städtischen Krankenhauses Neukölln.

